ANEXOS

ANEXO A. Manual de Operación del Sistema de Ultrafiltración con Flujo Tangencial (MidJet Benchtop System)

ADVERTENCIAS

1. El sistema debe de estar desconectado para cualquier inspección o modificación de algún elemento del sistema. La bomba puede encenderse accidentalmente provocando algún daño en la persona o una liberación de presión inesperada.
2. Para prevenir una fuga inesperada y posiblemente daños físicos, usar conectores en todas las tuberías.
3. Usar mangueras que no están diseñadas para bombas peristálticas provocará fallas constantes en la tubería, exponiendo al operador de daños físicos o derrames del fluido. Utilizar en todo momento mangueras especiales para usarse en bombas peristálticas.
4. Mantener la válvula de pellizco abierta cada vez que se va a iniciar la operación de alimentación al sistema. Si se enciende la bomba con la válvula cerrada, ejercerá una fuerte contrapresión provocando fugas o derrames del fluido en las tuberías.
5. La bomba de alimentación del sistema MidJet se calienta al permanecer mucho tiempo encendida. No tocar la bomba

PRECAUCIONES

1. Para evitar daños al equipo, planear cuidadosamente la instalación del sistema. Ver las instrucciones de instalación en la guía.
2. Las membranas de cartuchos de fibra hueca son fuertes y seguras. Un mal manejo de ellas puede dañar la membrana. Seguir la guía de prevención de daño a la membrana:
   a) Si la membrana de fibra hueca se seca, difícilmente se puede volver a humedecer. No permita que la membrana de ultrafiltración se seque.
   b) Manipular los cartuchos cuidadosamente y no someter la membrana a presiones muy altas durante su uso.
   c) Evitar apretar demasiado los conectores de las tuberías al momento de instalar el sistema.

- Plataforma para montaje

- Bomba peristáltica para utilizar dos diferentes tamaños de tubería
- Kit de accesorios para el sistema incluyendo:
  - Seis tanques de 30 ml y doce tanques de 120 ml cada uno con tapa y tuberías de entrada al tanque.
  - 1 válvula de pellizco
  - 10 adaptadores para tuberías de 1/8” (Luer- Lok)
  - 10 adaptadores para tuberías de 3/32”(Luer - Lok)
  - 6 adaptadores tipo tapadera (Luer-Lok)
  - 1.5 m (3 pies) de manguera de silicón tamaño 14
  - 1.5 m (3 pies) de manguera de silicón tamaño 16
- Manual de Instrucciones de uso/Instalación/ Seguridad

2. Aplicaciones

El sistema MidJet puede concentrar y diafiltrar soluciones biológicas de manera rápida y precisa. El sistema acepta membrana de cartucho de fibra hueca (MidGee o MidGee Hoop). Este tipo de membranas minimiza el efecto de polarización debido a la velocidad de flujo cruzado generado por la bomba de alimentación. Esto resulta en la recuperación efectiva y alta del producto que se desee obtener utilizando las condiciones de presión y flujo óptimas.

3. Descripción del Equipo y Accesorios del Sistema MidJet Benchtop

a. Plataforma para montaje

La plataforma incluye un soporte para instalar la bomba peristáltica y el cartucho. También tiene espacio para colocar dos recipientes de 120 ml y uno de 30 ml.

b. Bomba Peristáltica

El sistema incluye una bomba peristáltica de 24 volts DC de una sola velocidad. Al ajustar el seguro que está ubicado encima del cabezal de la bomba aumenta la velocidad de flujo, de lo contrario disminuye el flujo. La bomba permite utilizar tubería de tamaño 14 y 16.

c. Tanques de Deposito

El sistema MidJet incluye tanques de 30 ml y 120 ml, con sus respectivas tapas adaptadas con las tuberías de entrada al tanque. Los recipientes no pueden ser sometidos a alta presión por lo que son NO autoclavables. Dentro de los tanques se crea vacío permitiendo alimentar el fluido de un tanque a otro y al interior de la membrana. Además, permite que la solución retenida ingrese al tanque de alimentación por debajo del nivel del líquido evitando la formación de espumas. Cada tanque indica el volumen con el cual se está trabajando. El volumen exacto del sistema dependerá del tamaño de membrana que se esté utilizando.

d. Accesorios para Tuberías

El sistema incluye accesorios para tuberías, mangueras y una válvula de contrapresión.

Los accesorios para tuberías permiten conectar la tubería a los tanques de depósito.

Las mangueras de silicona son de 14 y 16”, especiales para bombas peristálticas. La velocidad de flujo máxima para la tubería de 14” es de 50 ml/min y la de tamaño 16” permite un flujo máximo de 140 ml/min.

La válvula permite regular y controlar la contrapresión a través de la membrana de cartucho de fibra hueca. La válvula debe instalarse en la línea de retenido, ésta, permite un ajuste preciso en la tubería para controlar la presión.

e. Membranas de Fibra Hueca de Polisulfona

Leer la guía para el uso y manipulación de membranas de fibra hueca. Anexo B

4. Instalación del Sistema MidJet System

a. Seleccionar un espacio adecuado para instalar el equipo. Asegúrese que el lugar este cerca de un toma corriente.

b. Instalar la bomba peristáltica

Figura 35. Bomba peristáltica de 24 volts DC de una sola velocidad.

1. Colocar la bomba encima de la plataforma para montaje y conectar el cable de corriente de la bomba

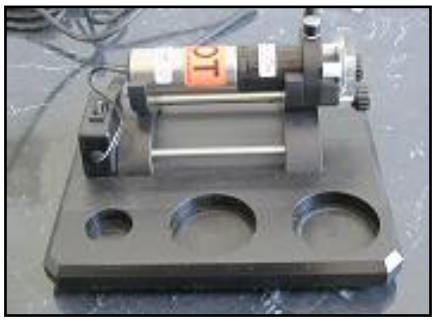

Figura 36. Plataforma de montaje y bomba peristáltica.

2. Desajustar la perilla que está encima del cabezal de la bomba. Girarla en cualquier dirección.

Figura 37. Perilla para ajustar la velocidad de flujo de alimentación al sistema.

3.Seleccionar el tamaño de tubería con el que se trabajará y cortar la manguera de 35 a 45 cm. Colocar los adaptadores (Luer Lok) en ambos extremos de la manguera.

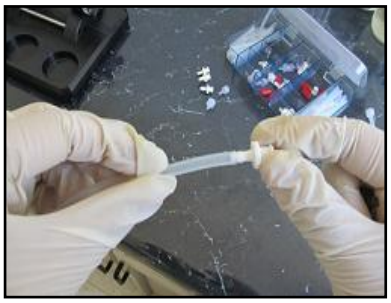

Figura 38. Kit de accesorios para tuberías, mangueras y una válvula de contrapresión.

3. Instalar la válvula de tres vías en la tubería de alimentación a la membrana.

Figura 39. Válvula de tres vías para la toma de muestras de la solución retenida.

4. Colocar la manguera en el cabezal de la bomba. Cubrir la manguera y girar la perilla hasta que quede ajustada.

Figura 40. Ajuste de la manguera de alimentación en la bomba peristáltica.

c. Posición de los tanques de depósito

Tomar un tanque de 120 mL con su respectiva tapadera que tiene tres entradas. Colocar el tanque en el espacio derecho que está frente a la bomba. Este tanque será el tanque que contendrá la solución de alimentación.

Figura 41. Tanque de 120 mL para la solución de alimentación.

Si se planea realizar una diafiltración. Tomar otro tanque de 120 mL con su respectiva tapadera que tiene tres entradas. Colocar el recipiente en el espacio que está en el centro frente a la bomba. (Lado izquierdo del tanque de alimentación). En este tanque se colocará la solución de lavado (buffer) que será alimentada constantemente al tanque de alimentación.

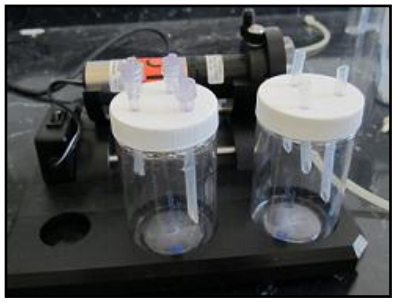

Figura 42. Tanque de 120 mL para la solución de lavado (Buffer TE) y solución de alimentación.

Tomar un recipiente de 30 mL con su respectiva tapadera que tiene tres entradas. Colocarlo en el espacio izquierdo del tanque de lavado. Este será el tanque de recolección de la solución permeada o filtrada.

Figura 43. Tanque de 30 mL para solución de filtrado, Tanques de 120 mL para solución de lavado y alimentación.

ADVERTENCIA

- Los tanques no están diseñados para ser sometidos a altas presiones. Son NO-AUTOCLAVABLES. Los recipientes pueden quebrarse exponiendo al operador a daños ocasionados por derrame de la solución contenida.

d. Instalar el Cartucho de Membrana de Fibra Hueca

Tapar una de las salidas de la línea de permeado con un adaptador solido Luer- Lok que se encuentra dentro del kit de accesorios para el sistema MidJet.

Figura 44. Membrana de fibra hueca para el sistema de ultrafiltración tangencial.

Cortar un tramo de manguera de una longitud de 30 cm (12 pulgadas). Colocar en ambos extremos un adaptador Luer Lok. Acoplar uno de los extremos en la salida de la línea de permeado del cartucho. Conectar el otro extremo de la manguera a una de las entradas del tanque de 30 ml.

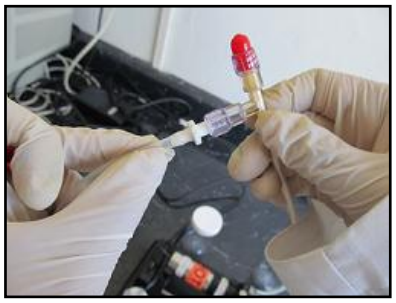

Figura 45. Salida de la membrana para la solución filtrada.

Cortar un tramo de manguera de una longitud de 40 cm (16 pulgadas). Instalar la válvula de contrapresión o de retención en la tubería. Colocar en ambos extremos un adaptador Luer Lok. Acoplar en la salida de la línea de retenido uno de los extremos. Conectar el otro extremo en una de las entradas del tanque de alimentación.

Figura 46. Válvula de retención o contrapresión en la línea de retroalimentación.

TIP

- No sobre ajustar los conectores Luer Lok. Tratar de mantener la longitud de las mangueras lo más corto posible. Utilizar mangueras de corta longitud minimiza el error del sistema.

e. Consideraciones para la Diafiltración

La conexión entre el tanque de alimentación y el tanque de la solución de lavado debe de estar bien cerrada para permitir que se cree vacío. De esta manera la solución de lavado fluirá con facilidad hacia el tanque de alimentación. Tapar los dos orificios restantes del tanque de lavado. Si no se va a realizar una diafiltración, remover la línea de diafiltración del proceso.

f. Conectar la corriente eléctrica

Conectar el cable de corriente de la bomba a 110-volt, 60 Hz o 220 volt, 50 Hz.

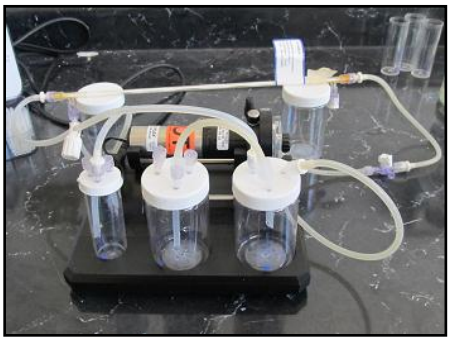

Figura 47. Sistema de ultrafiltración con flujo tangencial (MidJet Benchtop System.

TIP

- Trabajar con agua hasta familiarizarse con la operación del sistema. Esto permitirá identificar si hay alguna fuga en alguna tubería.

5. Operación del Sistema MidJet Benchtop System

Antes de utilizar el sistema de ultrafiltración asegúrese de haber leído la guía para membranas de cartucho de fibra hueca. Leer bien las especificaciones de la misma y procedimiento para lavar y almacenar la membrana. (Anexo B)

ADVERTENCIA

- Usar mangueras que no están diseñadas para bombas peristálticas provocará fallas constantes en la tubería, exponiendo al operador de daños físicos o derrames del fluido. Utilizar en todo momento mangueras especiales para usarse en bombas peristálticas.

5.1 Procedimiento para iniciar el sistema:

1. Encender el transductor de presión (en caso de tenerlo)
2. Agregar la solución de alimentación al tanque de alimentación (120 ml) y la solución de lavado en el tanque ubicado enseguida.
3. Abrir 100% la válvula de contrapresión
4. Encender la bomba peristáltica presionando el botón que está en la plataforma.
5. Ajuste el flujo de alimentación utilizando la perilla ubicada encima del cabezal de la bomba.
6. Ajuste la presión utilizando la válvula de contrapresión ubicada en la línea de retenido.

5. 2 Parámetros de Operación

Velocidad de Flujo de recirculación típico – 50-140 ml/min

Máxima presión de entrada – 30 psig (2 barg)

Presión de entrada típica para Microfiltración – 3-10 psig (0.2-0.7 barg)

Presión de entrada típica para Ultrafiltración – 10-20 psig (0.7-1.4 barg)

Máxima temperatura de operación- 60°C (140 °F)

Rango de pH – 2 a 13

ADVERTENCIA

- Mantener la válvula de retención abierta cada vez que se va a iniciar la operación de alimentación al sistema. Si se enciende la bomba con la válvula cerrada, ejercerá una fuerte contrapresión provocando fugas o derrames del fluido en las tuberías.

5.3 Volumen de Diafiltrado Constante

El sistema MIDJET es adecuado para alcanzar un volumen de diafiltrado constante, ya que la bomba permitirá la succión de la solución del tanque de alimentación y creara vacío permitiendo el fluido del tanque de la solución de lavado hacia el tanque de alimentación. Seguir los siguientes pasos para una buena diafiltración:

1. Llenar el tanque de depósito de la solución de lavado (Buffer) y cerrarlo con la tapa correspondiente. (Asegurar que este bien cerrado).
2. Conectar el tubo del tanque hacia una de las entradas del tanque de alimentación. (Conectarlo a la manguera más larga de la tapadera del tanque de alimentación).
3. Encender la bomba para circular la solución a través de la membrana. Una vez que la solución se esté permeando, se creará vacío permitiendo que la solución de lavado fluya hacia el tanque de alimentación.

5.4 Procedimiento durante el Experimento

Una vez instalado el equipo de ultrafiltración con flujo tangencial (MidJet Benchtop System) acoplado al equipo BiologicBio-Rad seguir el siguiente procedimiento durante cada corrida:

1. Encender el equipo Biologic Bio-Rad y el software LPData View.
2. Medir el volumen inicial de Lisado Clarificado (Solución de Alimentación a la Membrana)
3. Medir el volumen inicial de solución Buffer (Solución de Lavado)
4. Encender el equipo con la válvula de retención abierta.
5. Iniciar el programa LPData View presionando el botón Iniciar. (En este momento los datos de absorbancia y conductividad del flujo de permeado serán registrados mediante un detector de UV y un conductímetro con unidades de absorbancia (AU) y milisiemens (mS) respectivamente.
6. Ajustar la válvula hasta lograr regular el flujo de lavado y el flujo de retroalimentación. Los flujos deben de ser aproximadamente iguales para mantener el nivel del tanque de alimentación.
7. Dejar correr el sistema hasta que el tanque de depósito de la solución filtrada se llene. Apagar el sistema de ultrafiltración y presionar el botón Detener en el software LPData.
8. Medir el volumen del filtrado y tomar una muestra.
9. Medir el volumen de la solución buffer y del tanque de alimentación. (Este último debe de permanecer constante)
10. Las muestras de retenido deben de tomarse cada 10 minutos utilizando la válvula de tres vías ubicada en la línea de alimentación.
11. Repetir el procedimiento desde el paso 4 hasta obtener una conductividad cercana a la de la solución buffer.
12. Guardar la gráfica en el programa LPData View. Si se requiere, el software LPData View permite exportar los datos capturados durante la corrida a una base de datos en Excel.
13. Lavar la membrana recirculando agua alrededor de 15 minutos. Si se va a guardar por más de 2 semanas seguir las indicaciones de lavado. (Anexo B)
14. A cada muestra de retenido se hace pasar por el UV a 260 nm para medir densidad óptica de ácidos nucleicos y a una longitud de 280 nm para medir proteínas.
15. Los datos registrados durante el experimento se ajustaron al modelo obtenido en el capítulo II.

5.5 Para apagar el Sistema seguir los siguientes pasos:

1. Apagar el traductor de presión
2. Apagar la bomba
3. Desajustar la perilla ubicada encima del cabezal de la bomba
4. Limpiar el sistema siguiendo las indicaciones de la guía para membranas de cartucho de fibra hueca (Anexo B)

6. Mantenimiento del Sistema

- Inspección

  Revisar y cambiar la tubería de la bomba las veces que sean necesarias

  Verificar que todas las tuberías estén en las mejores condiciones

  ADVERTENCIA

- Usar mangueras que no están diseñadas para bombas peristálticas provocara fallas constantes en la tubería, exponiendo al operador de daños físicos o derrames del fluido. Utilizar en todo momento mangueras especiales para usarse en bombas peristálticas.

7. Especificaciones del Sistema MidJet Benchtop

- Modelo MDG-3SP

- Dimensiones aproximadas: 20 x 18 x 12 cm (8 x 7 x 5 pulgadas)

- Peso: 1.6 kg (3.5 lbs)

- Material:

  Tubería – silicona

  Tanques de Deposito: poliestireno

Accesorios de Tubería: nylon y policarbonato

ANEXO B. Instrucciones de Operación de Membranas de Fibra Hueca en el Sistema de Flujo Tangencial MidJet Benchtop

Las membranas se utilizan para operar en flujo cruzado. En comparación con las membranas de filtración normal, filtración con flujo cruzado involucra una línea de recirculación de la solución de alimentación a través de la superficie de la membrana impulsada por una bomba peristáltica.

1.Procedimiento para el uso de una nueva membrana de fibra hueca

Remoción del glicerol de la membrana

Las membranas de ultrafiltración requieren de un pre tratamiento con una solución de alcohol/glicerol para evitar el secado de las membranas durante su transporte. Es necesario remover todo el glicerol de la membrana antes de usarse. Además, el glicerol minimiza la entrada de aire hacia los poros formando una capa la cual reduce permeabilidad hasta que el aire haya sido completamente desplazado por el líquido. Seguir los siguientes pasos para realizar una buena limpieza de la membrana antes de utilizarse:

1. Utilizar agua limpia y tibia a una temperatura máxima de 50°C. Si el agua esta fría la limpieza de la membrana será menos efectiva. Agregar 100 ppm de NaOCl para ayudar a la remoción de glicerol.
2. Ajustar la presión transmembrana del cartucho a 15 psig para membrana de tamaño de poro de 100 kDa y 300 kDa; para membranas de 500 – 30000 kDa ajustar la presión a 10 psig y una presión de 5 psig para tamaño de poro más grande.
3. El flujo de retenido debe de ser aproximadamente 1/10 del flujo de filtrado o permeado.
4. Desechar ambos el filtrado y retenido al drenaje.

5. Continuar limpiado la membrana hasta haber obtenido por lo menos 100 ml de filtrado. Asegúrese de que todo el NaOCl haya sido removido por completo antes de introducir la solución deseada.
6. Realizar una última evaluación de limpieza utilizando agua desionizada. Registrar los datos y condiciones del fluido (presión, flujo, temperatura) para asegurar que la membrana este completamente limpia. **Un flujo muy lento de agua indica que aún existen contaminantes y que no se realizó una limpieza adecuada a la membrana.**
7. Acondicionar la membrana antes de empezar el experimento. Introducir al sistema una solución buffer por 10 minutos para lograr humedecer y homogenizar todas las áreas del sistema.

2. Flujo de Alimentación al sistema

La corriente de alimentación tiene un gran efecto sobre el flux del permeado. Una guía sobre el flujo de recirculación a través de la membrana se presenta en la Tabla 5.Los datos propuestos están en función del tipo de membrana, diámetro interno y esfuerzo de corte. La caída de presión a lo largo de la membrana está en función del flujo de alimentación y puede utilizarse para determinar el flujo de retroalimentación. La suma del flujo de filtrado y flujo de recirculación provee el flujo de alimentación.

Parámetros de operación para la membrana

Presión máxima de entrada: 3.5 barg (50 psig)

Presión típica de entrada: 0.7-1.4 barg (10-20 psig)

Temperatura máxima: 60°C (140°F)

Rango de pH: 2-13

Tabla5. Propiedades Físicas de membranas de fibra hueca de polisulfona para un sistema de flujo tangencial (Midjet System)

Estilo	Nominal ID (mm)	Número de Fibras	Longitud Nominal(cm)	Área de la membrana cm^2
MM	0.5	6	30	26
	0.75	4	30	24
	1	2	30	16
H22L	0.75	2	60	29
	1	2	60	38
H24L	0.5	4	60	42
H42L	0.5	2	110	0.6
	1	2	110	2

Tabla 6. Flujo Nominal de Alimentación y Caída de Presión en función de esfuerzo de corte

Esfuerzo de corte		200		2000		8000		16000	
Estilo	Nominal ID (mm)	Flujo (ml/min)	ΔP (psig)	Flujo (ml/min)	ΔP (psig)	Flujo (ml/min)	ΔP (psig)	Flujo (ml/min)	ΔP (psig)
MM	0.5	12.5	0.7	25	1.5	50	2.5	100	5.5
	0.75	20	0.5	40	1	80	2	160	4
	1	25	0.5	50	0.75	100	1.5	200	4.5
H22L	0.75	10	1	20	2	40	4	80	8
	1	25	0.8	50	1.5	100	3	200	9
H24L	0.5	8.5	1.5	17	3	33	5	66	10
H42L	0.5	4	2.5	8.5	5	17	10	33	19
	1	25	1.5	1.5	3	100	6	200	16

El esfuerzo de corte y el flujo de alimentación son directamente proporcionales. Los valores de esfuerzo de corte se basaron en viscosidad de 1 cp.

3. Almacenamiento de la Membrana

Los cartuchos de ultrafiltración deben de humedecerse antes de ser guardados o almacenados. Si se va a guardar un periodo de corto, máximo de dos semanas, se puede dejar la membrana humedecida en agua. Para almacenar un periodo más largo llenar los cartuchos con alguna de las siguientes soluciones:

1. Agua con 5-10 ppm de cloro. (se debe monitorear cada semana)
2. 0.1 N de hidróxido de sodio
3. 3% de formalina
4. Solución de etanol 30%.

Asegurar que la membrana permanezca húmeda para evitar que se seque.

ANEXO C. Programa utilizado para Regresión no Lineal

```
function Problema
clear, clc, format short g, format compact
xyData=[29.7    0.24692
34.65   0.25383
39.6    0.25306
44.55   0.28334
54.45   0.38257
64.35   0.55864
72.27   0.56325
84.15   0.60801
100.98  0.62799
133.65  0.70739
183.15  0.78583
217.8   0.81772
232.65  0.84225
287.1   0.87904];
X = xyData(:,1);
m = size(X,1);  %Determina el numero de puntos
Y=xyData(:,2);
problema = (['Regresion no lineal']);
var_dep = ['Sigma'];
var_indep = ['V_D'];
parm = [1 90]; % valores iniciales de los parametros
npar = size(parm,2); % Determina el nuemro de parametros
options = optimset('MaxFunEvals',1000); % Cambia los valores de la funcion
MaxFunEvals
Beta = fminsearch(@sigma,parm,options,X,Y); % Encuentra los valores optimos
usando la fincion fminsearch
[f,Ycalc] = sigma(Beta,X,Y); % Calcula los valores de  Y (Ycal)
disp(['   Results,' problema]);
 Res = [];
for i=1:npar
    Res=[Res; i Beta(i)];
end
disp('     Valor de los parametros     ');
 disp(Res);
 plot(X,Ycalc,'r-',X,Y,'b+' ) %grafica los valores experimentales de y y los
valores calculados
xlabel([var_indep])
ylabel([var_dep])
function [f,Ycalc]=sigma(parm,X,Y)   % Define la funcion de Sigma
sm=parm(1);
k=parm(2);
% c=parm(3);
for i=1:size(X,1);
Ycalc(i,1)= sm*X(i)/(k + X(i));
end
resid(:,1)=Y-Ycalc;
f=resid'*resid;
```